

PCT/JP99/02121

日 本 国 特 許 庁 09/673884
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT
21.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年11月 6日

REC'D 22 JUN 1999

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第315243号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant (s):

寶酒造株式会社

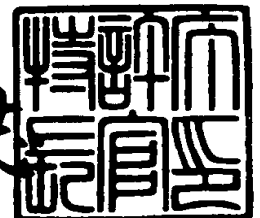
5
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3035420

【書類名】	特許願
【整理番号】	TS-10-011
【提出日】	平成10年11月 6日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 9/00
【発明の名称】	DNAの合成方法
【請求項の数】	30
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内
【氏名】	上森 隆司
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内
【氏名】	佐藤 好美
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内
【氏名】	藤田 朋子
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内
【氏名】	三宅 一恵
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内
【氏名】	向井 博之
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中

央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第114005号

【出願日】 平成10年 4月23日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【物件名】 委任状 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNAの合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酸性物質を含有してなる DNA ポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項 2】 酸性物質が酸性高分子物質である請求項 1 記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項 3】 酸性高分子物質が酸性多糖である請求項 2 記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項 4】 酸性高分子物質が、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチン、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、DNA およびそれらの塩からなる群より選択された 1 種以上である請求項 2 または 3 いずれか記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項 5】 フコース硫酸含有多糖がフコース硫酸含有多糖-F またはフコース硫酸含有多糖-U である請求項 4 記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項 6】 DNA 合成反応を行なうに際し、請求項 1～5 いずれか記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤の存在下に DNA ポリメラーゼを用いて反応を行なうことを特徴とする DNA 合成方法。

【請求項 7】 2 種以上の DNA ポリメラーゼを使用する請求項 6 記載の DNA 合成方法。

【請求項 8】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さない他の DNA ポリメラーゼとを使用する請求項 7 記載の DNA 合成方法。

【請求項 9】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを使用する請求項 7 記載の DNA 合成方法。

【請求項 10】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを使用する請求項 9 記載の DNA 合成方法。

【請求項 11】 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう請求項 6～10 いずれか記載の DNA 合成方法。

【請求項 12】 請求項 1～5 いずれか記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤を含有してなる DNA 合成反応用組成物。

【請求項 13】 さらに DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 12 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 14】 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 13 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 15】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 14 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 16】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを含有してなる請求項 15 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 17】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さない他の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 14 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 18】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる DNA 合成反応用組成物。

【請求項 19】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを含有してなる請求項 18 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 20】 DNA 合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする DNA 合成方法。

【請求項 21】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを使用する請求項 20 記載の DNA 合成方法。

【請求項 22】 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう請求項 20 または 21 記載の DNA 合成方法。

【請求項 23】 試験管内 DNA 合成に使用されるキットであって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなるキット。

【請求項 24】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを含有してなる請求項 23 記載のキット。

【請求項 25】 さらに DNA 合成に使用される試薬を含有してなる請求項 23 または 24 記載のキット。

【請求項 26】 DNA ポリメラーゼが、耐熱性 DNA ポリメラーゼである請求項 23 ～ 25 いずれか記載のキット。

【請求項 27】 試験管内 DNA 合成に使用されるキットであって、請求項 1 ～ 5 いずれか記載の DNA ポリメラーゼ活性促進剤および DNA ポリメラーゼを含有してなるキット。

【請求項 28】 さらに DNA 合成に使用される試薬を含有してなる請求項 27 記載のキット。

【請求項 29】 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 27 または 28 記載のキット。

【請求項 30】 DNA ポリメラーゼが、耐熱性 DNA ポリメラーゼである請求項 27 ～ 29 いずれか記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学分野において有用な DNA の合成方法ならびに該方法に使用される組成物およびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究において DNA の合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖の DNA の合成を除けば、そのほとんどは DNA ポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。したがって DNA 塩基配列決定、DNA の標識、部位特異的変異導入のための試薬として、DNA ポリメラーゼは高い価値を有している。また最近ではポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法の開発により、耐熱性 DNA ポリメラーゼが注目を集め、PCR 法に適した種々の DNA ポリメラーゼが開発され、商品化されている。

【0003】

現在知られているDNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列の共通性から大きく4つのファミリーに分類することができ、中でもファミリーA（ポリⅠ型酵素）とファミリーB（ α 型酵素）が大多数を占めている。それぞれのファミリーに属するDNAポリメラーゼは概ね類似した生化学的特性を有しているが、詳細に比較すると個々の酵素によって基質特異性、基質アナログの取込み効率、プライマー伸長性の強さおよび速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性の付随、温度、pHなどの至適反応条件、また阻害剤に対する感受性などについて異なる性質を有している。したがって、これまでは入手可能なDNAポリメラーゼの中から用途に最も適した性質を有するものを選んで使用されてきた。

【0004】

超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) は α 型に属するDNAポリメラーゼを生産しており、すでにその遺伝子も単離されている [ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第21巻、259～265 頁 (1993)]。最近、これまでに知られているDNAポリメラーゼとはまったく構造的な類似のない新規のDNAポリメラーゼが該菌株から発見された。このDNAポリメラーゼは2種の新規タンパク質が複合体を形成してDNAポリメラーゼ活性を発現する。また、該酵素は強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性と優れたプライマー伸長活性とを示し、例えば該酵素をPCRに用いた場合には20kbもの長さのDNA断片を増幅することが可能である。

【0005】

一方、DNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応では、使用する酵素の選択と同様にその反応条件を適切なものに設定することが重要である。反応条件の主なものとしては反応液の組成、pH、反応温度などがあり、これらの条件を使用する酵素や目的に応じて設定しなければならない。しかしながらこのような設定が困難な場合もある。

【0006】

また、複数のDNAポリメラーゼを組み合わせることで単独のDNAポリメラーゼでは不可能であった効率のよいDNA合成が可能となることが知られている [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オ

ブサイエンシースオブザUSA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第91巻、第5695～5699頁(1994)]。該方法は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ(例えば上記のピロコッカス フリオサス由来α型DNAポリメラーゼ)と該活性を有していないDNAポリメラーゼ[例えばサーマス アクアティカス (Thermus aquaticus)由来のDNAポリメラーゼ (Taq polymerase)]とを混合してPCRに使用するというものであり、LA-PCR法として知られている。この方法により、従来行われてきた1種のDNAポリメラーゼのみを使用するPCRに比べて増幅されるDNAの収量が増加する。また、従来のPCRでは増幅できなかった長鎖長のDNAを増幅することも可能となる。ただし、このような効果は上記のように3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素と該活性を有さない酵素との組み合わせに限って発揮される。

【0007】

上記のようにDNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応は遺伝子工学的実験手法として必要不可欠なものであり、その効率を向上させることは研究全体を効率よく行なう上でも重要である。しかしながら現在使用されている反応系は至適化されたものとは言えない。このため、これまでのDNA合成反応に比べて優れた効率でDNA合成を実施することが可能な方法が求められている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、(1) DNAポリメラーゼ活性促進剤、(2) 該DNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、(3) 該DNAポリメラーゼ活性促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物、(4) 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるDNA合成反応用組成物、(5) DNA合成反応を行なうに際し、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法、(6) 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるキットおよび(7) 前記DNAポリメラーゼ活性促進剤およびDNAポリメラーゼを含有してなるキットを提供すること

にある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、酸性物質の共存下においてDNAポリメラーゼによるDNA合成反応の効率が向上することを見い出した。また、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを混合した場合に極めて効率のよいDNA合成が起こることを見い出した。さらに、これらの技術を組み合わせることにより、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明の要旨は、

- 〔1〕 酸性物質を含有してなるDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔2〕 DNA合成反応を行なうに際し、前記〔1〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下にDNAポリメラーゼを用いて反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、
- 〔3〕 前記〔1〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物、
- 〔4〕 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるDNA合成反応用組成物、
- 〔5〕 DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法、
- 〔6〕 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるキット、ならびに
- 〔7〕 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、前記〔1〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤およびDNAポリメラーゼを含有してなるキット、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

(I) 本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤は、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する作用を有するものであり、電荷的に負の電荷を有する物質またはその塩、なかでも酸性物質またはその塩を含有することを1つの大きな特徴とする。

【0012】

このDNA合成活性を促進する作用は、単位時間当たりの新規合成DNA鎖の鎖長やPCRにおける増幅産物量によって調べることができる。また、通常のDNAポリメラーゼ活性測定、例えば、新規合成DNA鎖への標識ヌクレオチド取り込み活性の測定を行なう際に該物質を添加し、添加しない場合の活性と比較することによって調べることができる。かかる「DNA合成活性を促進する作用」には、合成反応の効率を向上させる作用をも包含する。

【0013】

DNA合成活性を促進する作用を有する酸性物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、酸性多糖のような酸性高分子物質を使用することができる。またポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、鋳型として機能しないDNA（すなわち、対象となるDNAの合成のための鋳型とはならないDNA）等も使用することができる。なお、本明細書において酸性物質とはその塩をも含有する。本発明に使用することができる酸性多糖としては、例えば、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸などに代表される硫酸基を含有する硫酸化多糖類、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチンなどのポリウロン酸などが包含される。また、フコース硫酸含有多糖としては、例えば、フコース硫酸含有多糖-Fまたはフコース硫酸含有多糖-Uを使用することができる。ここで、フコース硫酸含有多糖-Fとは、例えば国際公開第97/26896号パンフレットに記載の方法により、あるいは国際公開第97/47208号パンフレットに記載の方法により褐藻植物などより得られる、ウロン酸を実質的に含まないフコース硫酸含有多糖をいう。また、フコース硫酸含有多糖-Uとは、前記パンフレットに記載の方法により得られる、ウロ

ン酸を含むフコース硫酸含有多糖をいう。

【0014】

前記酸性物質の塩としては、DNA合成活性を促進する作用を有するものであれば特に限定されないが、水溶性の塩が好ましい。例えばデキストラン硫酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、ポリグルタミン酸ナトリウム、ヘパリンナトリウム、デキストラン硫酸カリウム、ヘパリンリチウムなどのアルカリ金属塩などが挙げられる。

【0015】

前記酸性物質は、例えば、DNA合成活性を促進する作用を保持している物質であれば、天然物から単離精製されたものでもよく、化学的または酵素的な合成物でもよい。また、前記酸性物質は、該酸性物質を含有する未精製物または部分精製物であってもよい。さらに、DNA合成活性を促進する作用を保持している範囲で適当な修飾を施されていてもよい。また、分子量が適当なものとなるような分解操作を施したり、その後に分子量分画を行なったものであっても、DNA合成活性を促進する作用を有する物質であれば、使用することができ、本発明には分子量数千以上の酸性物質が好適に使用できる。さらに、これらの物質は単独で、または混合して使用することができる。

【0016】

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤の作用は、特に限定するものではないが、DNAポリメラーゼの活性を効率よく発揮せしめ、もしくはDNAポリメラーゼを保持することによって酵素のDNAへの非特異的な相互作用を抑制することにあると考えられる。

【0017】

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤がその活性を促進するDNAポリメラーゼには特に限定はなく、例えば、ポリⅠ型DNAポリメラーゼ（大腸菌DNAポリメラーゼⅠ、クレノウ・フラグメント、サーマス アクアティカス (*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ (Taq polymerase) など)、 α 型DNAポリメラーゼ [上記のピロコッカス フリオサス由来 α 型DNAポリメラーゼ、サーモコッカス リトラリス (*Thermococcus litralis*)由来DNAポリメラーゼ

(VENT DNA polymerase)、ピロコッカス sp.(Pyrococcus sp.) 由来DNAポリメラーゼ(KOD DNA polymerase)、ピロコッカス sp. GB-D(Pyrococcus sp. GB-D) 由来DNAポリメラーゼ(DEEP VENT DNA polymerase)など]、これらのどちらにも属さない非 α 非ポリ I 型DNAポリメラーゼが挙げられる。なお、ポリ I 型DNAポリメラーゼ、 α 型DNAポリメラーゼはともにそのアミノ酸配列上の相同性から分類される一群の酵素を指し、そのアミノ酸配列上の特徴はヌクレイック アシックス リサーチ、第15巻、4045~4057頁(1991)に記載されている。

【0018】

また、非 α 非ポリ I 型DNAポリメラーゼとしては、例えば国際公開第97/24444号パンフレットに記載のピロコッカス フリオサス由来DNAポリメラーゼが挙げられる。なお、本明細書においては、同じくピロコッカス フリオサスの生産する α 型DNAポリメラーゼと区別するため、前記ピロコッカス フリオサス由来の非 α 非ポリ I 型DNAポリメラーゼをPfu DNAポリメラーゼIIと記載する。また、前記ピロコッカス フリオサス由来の α 型DNAポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼIと記載する。

【0019】

Pfu DNAポリメラーゼIIは、以下に示すような性質を有する酵素である。

Pfu DNAポリメラーゼIIの性質：

1) 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。

2) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

3) λ DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション(PCR)を以下の条件で行なった場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である：

PCRの条件：

(a) 反応液組成：10 mM トリス-塩酸(pH 9.2)、3.5 mM 塩化マグネシウム、75 mM 塩化カリウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dC

TP, dGTPおよびdTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1%
トリトンX-100、5.0ng/50 μ l λ DNA、10pmole/50 μ l
プライマー λ A（配列表の配列番号：1）およびプライマー λ B（配列表の配列番号：2）、ならびに3.7U/50 μ l DNAポリメラーゼを含む；

（b）反応条件：98℃、10秒～68℃、10分を1サイクルとした30サイクルのPCRを行なう。

4）SDS-PAGE上で約90,000ダルトン、約140,000ダルトンに相当する2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク質よりなる。

【0020】

また、前記Pfu DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子はすでにクローニングされており、該遺伝子を含有するプラスミドpFU1001で形質転換された大腸菌JM109は *Escherichia coli* JM109 /pFU1001 と命名、表示され、平成7年8月11日（原寄託日）より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号：305-8566））に受託番号：FERM BP-5579として寄託されている。したがって、該形質転換体を培養し、得られた培養物より、例えば、国際公開第97/24444号パンフレット（28～29頁、実施例3）に記載の方法により、前記Pfu DNAポリメラーゼIIを取得することができる。

【0021】

上記のような各種のDNAポリメラーゼを使用するDNA合成反応において、その反応液中に本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加することにより、驚くべきことに該DNAポリメラーゼによるDNA合成の効率が向上する。この場合、2種以上のDNAポリメラーゼ、例えば、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼ（例えば、 α 型のDNAポリメラーゼと非 α 非ボルI型のDNAポリメラーゼ）、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さない他のDNAポリメラーゼを使用する場合にも同様にDNA合成の効率が向上する。

【0022】

例えば、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合、添加せずPCRを行なった場合に比較して増幅産物の量が増加する。増幅産物の量は、例えば、PCR後の反応液の一定量を電気泳動に供し、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドなどで染色し、増幅産物に由来するバンドの蛍光の強度をイメージングアナライザーなどを用いて測定することにより定量化することができる。前記のようにして増幅産物の量を定量化し、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合と添加せずPCRを行なった場合とを比較した場合、増幅対象物の長さ、GC含量などにより増減するが、増幅産物量は、約2～5倍の増加が見られる。また、少量の鋳型DNAからも効率よいDNAの増幅が可能である。

【0023】

さらに、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を用いたPCRにおいて、同じ量の増幅産物を得るために要する反応時間が従来のPCRに比べて短縮される。

【0024】

一般にPCRでは二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニールリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップによりDNAの増幅が実施される。また、“シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれる前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニールリング及び伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応でもDNAの増幅が実施される。本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤は、特に上記の伸長のステップに要する時間を短縮することができるため、前記3ステップ反応と2ステップ反応のいずれにおいても、合成反応全体に要する時間を短縮することができる。

【0025】

ここで、従来のPCRによって同じ量の増幅産物を得るために要する反応時間は、例えば、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合の増幅産物量を基準として調べることができる。すなわち

、当該促進剤を添加せずに実施されたPCRの各サイクルごとに反応液をサンプリングして、増幅産物の量を前記のようにして定量化し、これが本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に得られた増幅量と同一量になるまでのサイクル数を決定し、そのサイクル数と1サイクル当たりの所要時間から算出することにより求めることができる。また、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を用いたPCRの1サイクル当たりの所要時間は、通常のPCRの1サイクル当たりの所要時間に比べて短く設定することができる。1サイクル当たりの所要時間は、例えば、3ステップ反応においては、変性、プライマーのアニーリング、プライマーの伸長の各ステップの保持時間及び変性からプライマーのアニーリング、プライマーのアニーリングからプライマーの伸長、さらにプライマーの伸長から次サイクルにおける変性までの各設定温度になるまでの時間の合計より求めることができる。2ステップ反応においても上記のように各ステップの保持時間及び各ステップ間の移行時間の合計より求めることができる。本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合の全所要時間と添加せずPCRを行なった場合の全所要時間とを比較した場合、増幅対象物の長さ、GC含量などにより増減するが、約 $1/5 \sim 1/2$ に短縮される。

【0026】

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤は、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

【0027】

(II) 本発明のDNA合成反応用組成物

本発明のDNA合成反応用組成物としては、一つの態様として、例えば上記の(I)に示されたDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するものが挙げられる。該組成物はDNAポリメラーゼを用いたDNA合成に必要な各種成分、例えばdNTP、塩化マグネシウムや適正なpHを保つための緩衝成分を含んでいてもよい。さらにDNAポリメラーゼを含んでいてもよい。

【0028】

DNA合成反応用組成物に含有されるDNAポリメラーゼには特に限定はなく、上記の(I)に示された各種のDNAポリメラーゼが挙げられる。DNAポリメラーゼは1種の酵素のみが含まれていてもよく、2種以上(複数種)の酵素が含まれていてもよい。例えば、複数種のDNAポリメラーゼを含有する場合、上記のLA-PCRに使用される3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと有さないDNAポリメラーゼの組み合わせであってもよい。また、耐熱性のDNAポリメラーゼが含有された本発明のDNA合成反応用組成物は、高次構造を形成しやすい塩基配列を有するDNAの合成やPCRへの使用に適している。

【0029】

また、本発明のDNA合成反応用組成物の別の態様として、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有する組成物が挙げられる。該組成物も上記のようなDNA合成に必要な各種成分および/または上記のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するものであってもよい。

【0030】

複数のDNAポリメラーゼを含有する組成物としては、従来、LA-PCR法に利用される組成物が知られていた。上記のように、LA-PCR法に利用される組成物は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと、該活性を有さないあるいは該活性を発揮しないDNAポリメラーゼとを組み合わせで調製されている。

【0031】

本発明者らは、驚くべきことに3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼどうしを組み合わせた場合にはLA-PCR法よりも合成効率に優れたDNA合成反応が達成されることを明らかにした。なお、ここで「3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する」とは、天然のDNAポリメラーゼが有している3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が、化学的もしくは遺伝子工学的な方法によって除去、あるいは低減されていないこと、すなわち、該活性を実質的に有していることを意味する。

【0032】

このような組成物としては、特に限定するものではないが、例えば α 型に属する耐熱性DNAポリメラーゼと非 α 非ボルI型に属する耐熱性DNAポリメラーゼとを組み合わせた組成物を挙げることができる。また、上記のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加することにより、該組成物の性能はさらに向上する。

【0033】

該組成物の有する特徴のひとつは単位時間当たりのDNA合成速度が非常に高いことにある。該組成物をPCR法に使用した場合、同一鎖長のDNAの増幅に要する時間は従来のPCR法、LA-PCR法に比べて短い。したがって従来法ではDNAの増幅が不可能であったPCR条件においてもDNAの増幅が可能である。

【0034】

本発明のDNA合成反応用組成物は、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

【0035】

(III) 本発明のDNA合成方法

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤、あるいは本発明のDNA合成反応用組成物を使用して反応液を調製することにより、従来よりも高い効率でDNA合成反応を行なうことができる。例えば、本発明のDNA合成方法をPCR法に利用した場合には、従来のPCR法、またはLA-PCR法よりも短時間の反応で増幅産物を得ることができる。

【0036】

本発明のDNA合成方法の態様としては、2種以上のDNAポリメラーゼを使用する方法、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さない他のDNAポリメラーゼとを使用する方法、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用する方法、 α 型のDNAポリメラーゼと非 α 非ボルI型のDNAポリメラーゼとを使用する方法が挙げられる。さらに前記DNA合成方法をPCR

法により行なう方法等も挙げられる。

【0037】

本発明のDNA合成方法によれば、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

【0038】

また、DNAの標識、ジデオキシ法による塩基配列の決定などのDNAポリメラーゼを利用した操作にも本発明のDNA合成方法を利用することが可能である。

【0039】

(IV) 本発明のDNA合成方法に使用されるキット

本発明のキットを使用することにより、より簡便に効率よくDNAを合成することができる。このようなキットとしては、DNAの合成を伴う反応に用いられるキットであれば特に限定されるものではなく、試験管内でのDNA合成反応を行なうためのキットが挙げられる。具体的には、例えば、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定のためのキット、DNA標識用キット、PCR用キット、cDNA合成用キット、部位特異的変異導入用キットなどが挙げられる。

【0040】

本発明のキットにおいては、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤および／または3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有することを1つの大きな特徴とする。即ち、一つの態様として本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するキット、他の態様として3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有するキットが挙げられる。さらに本発明においては、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼとを含有するキットも含まれる。

【0041】

DNAポリメラーゼ活性促進剤としては、前記(I)で述べた酸性物質が挙げられ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラー

ぜとしては、例えば α 型のDNAポリメラーゼと非 α 非ポリI型のDNAポリメラーゼが挙げられ、耐熱性DNAポリメラーゼであることが好ましい。本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有したキットは、さらに1種又は2種以上の適当なDNAポリメラーゼを含んでおり、特に、耐熱性DNAポリメラーゼが好適に使用される。前記キットには、いずれの態様においても、例えば、dNTP、塩化マグネシウム、反応液を適正なpHに保つための緩衝成分などのDNAポリメラーゼの反応に必要な試薬を含んでいてもよい。

【0042】

前記DNAポリメラーゼ活性促進剤およびDNAポリメラーゼは、単独のコンポーネントの状態または反应用緩衝液などに添加された状態でキットに含有されていてもよい。

【0043】

本発明のキットを使用したDNA合成反応は、単位時間あたりのDNA合成量が、通常の反応系で行なった場合に比べ、非常に多いため、DNA標識、PCR、cDNA合成、部位特異的変異導入などに代表されるDNA合成反応を伴う各種の操作に適用した場合、操作に要する時間を短縮できるという優れた効果を発揮する。例えば、前記キットをPCRに適用した場合、同一鎖長のDNAの増幅に要する時間は従来のPCR法やLA-PCR法に比べてより短い。したがって従来法ではDNAの増幅が不可能であったPCR条件下においてもDNAの増幅が可能となる。また、本発明のキットは、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

【0044】

また、本発明のキットを利用し、PCR法により核酸の増幅を行なうことにより、増幅反応全体に要する時間を短縮し、あるいは増幅反応によって得られる産物の収量を向上させることができるという優れた効果を発揮する。この場合、キットに含まれるPCRに必要な試薬を混合して増幅反応液を調製し、さらに当該反応液に酸性物質を加えたうえで、変性、アニーリング、伸長の各工程を繰返す

サイクル反応を実施する。酸性物質は反応時間の短縮および／または増幅産物の収量の増加に有効な量が添加されていればよい。さらに、本発明のキットを利用したPCR法では、利用しないPCR法に比較して増幅される断片の鎖長が長くなるという優れた効果を発揮する。

【0045】

上記の反応液には以下のような成分が含まれる；1) 鋳型となる核酸、2) 適当な反応緩衝液、3) DNAポリメラーゼ、4) dATP、dTTP、dGTP および dCTP、5) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマー。酸性物質は調製後の該反応液にその有効量を添加してもよく、あるいは、反应用緩衝液の成分として添加されていてもよい。

【0046】

【実施例】

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

【0047】

下記実施例において、市販の酵素の活性は各酵素の表示に基づいて示した。ただし、Pfu DNAポリメラーゼIIの酵素活性単位は実施例1記載の酵素活性測定方法により得られた値により示した。また、市販の酵素を含む反応液の調製は、特に断りのない限り各酵素の説明書にしたがうか、あるいは添付されている反应用緩衝液を使用して調製した。PCRは特に断りのない限りジーンアンプ

PCRシステム9600 (GeneAmp PCR System 9600、パーキナーエルマー社製) を使用して実施した。

【0048】

実施例1 Pfu DNAポリメラーゼIIの調製

Pfu DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子を含むプラスミドpFU1001で形質転換された大腸菌JM109、Escherichia coli JM109 / pFU1001 (FERM PB-5579) を培養して得られる菌体よりPfu DNAポリメラーゼIIを精製し、以下の操作に使用した。なお、形質転換体の培養、酵素の精製は国際公開第97/24444号パンフレット (例えば、28～

29頁、実施例3等)に記載の方法にしたがって行なった。

【0049】

なお、上記の Pfu DNAポリメラーゼ I I の酵素活性は以下の方法で測定した。基質には仔牛胸腺DNA (ワージントン社製) を活性化したもの (活性化DNA) を用いた。DNAの活性化およびDNAポリメラーゼ活性の測定は、ハーパー アンド ロー社発行、D. R. デービス (D. R. Davis) 編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ (DNA polymerase from Escherichia coli) 第263 ~276 頁 (C. C. リチャードソン著) に記載の方法で行なった。活性を測定しようとする試料 5 μ l に反応液 [20 mM トリス-塩酸 (pH 9.0)、15 mM 塩化マグネシウム、2 mM 2-メルカプトエタノール、0.2 mg/ml 活性化DNA、それぞれ 40 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、60 nM [3 H] dTTP (アマシャム社製)] 45 μ l を添加し、75℃で5分間反応させた。そのうちの40 μ l をDEペーパー (ワットマン社製) にスポットし、5重量% Na₂HPO₄ で洗浄を5回行なった後にDEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。上記の酵素活性測定方法によって30分間あたりに10 nmol の [3 H] dTMP を基質DNAに取り込む酵素量を酵素1 Uとした。

【0050】

実施例2 プライマーの作製

λ DNAの塩基配列をもとに λ 1 ~ λ 5、 λ 7 ~ λ 10の9種類のプライマーを合成した。プライマー λ 1 ~ λ 5、 λ 8 ~ λ 10の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号: 3 ~ 10に示す。さらに λ 7の塩基配列を配列表の配列番号: 11に示す。これらのプライマーの組み合わせによって λ DNAを鋳型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表1に示す。

【0051】

【表 1】

表 1

プライマー対	増幅DNA断片の鎖長
$\lambda 1/\lambda 2$	0.5 kb
$\lambda 1/\lambda 3$	1 kb
$\lambda 1/\lambda 4$	2 kb
$\lambda 1/\lambda 5$	4 kb
$\lambda 1/\lambda 7$	8 kb
$\lambda 1/\lambda 8$	10 kb
$\lambda 1/\lambda 9$	12 kb
$\lambda 1/\lambda 10$	15 kb

【0052】

実施例 3 酸性物質による DNA ポリメラーゼ活性の促進

(1) Pfu DNAポリメラーゼ I I の活性への影響

酸性物質として国際公開第 97/26896 パンフレットに記載の方法（例えば、実施例 7、第 77 頁 8 行～第 78 頁 13 行、及び実施例 9、第 79 頁 7 行～18 行等）で得られたフコース硫酸含有多糖-F、仔牛胸腺 DNA（ワージントン社製）、ヘパリン（和光純薬社製）を使用し、これらが Pfu DNAポリメラーゼ I I の活性に与える影響を調べた。

【0053】

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー $\lambda 1$ および $\lambda 3$ 、DNA ポリメラーゼとして Pfu DNAポリメラーゼ I I を含む反応液を調製し、PCR を行なった。

【0054】

反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP および dT

TP、0.01% BSA、および1.25UのPfu DNAポリメラーゼI、500pgのλDNA、5pmolずつのプライマーλ1およびλ3（最終容量は25μl）。

【0055】

さらに前記反応液中に、それぞれ5ngのフコース硫酸含有多糖-F、200ngの仔牛胸腺DNAまたは0.5ng、1ng、2ng、5ngのヘパリンを添加した。

【0056】

反応は98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした25サイクルで行なった。なお、本明細書においては、「98℃、0秒」、「68℃、0秒」などの記載は、温度が設定された温度に達したと同時に次の設定温度への以降が起こるように反応装置をプログラムしたことを示す。

【0057】

反応終了後、反応液5μlを0.00005%のエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。その結果、どの酸性物質を添加した場合でも予想される1kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。0.5ngのヘパリンを添加した場合は特に効率良く増幅されていた。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、1kbの増幅断片は確認できなかった。

【0058】

さらに、長鎖長のDNAの増幅について検討をおこなった。鋳型のλDNA量を2.5ngに、またプライマー対をプライマーλ1およびλ5あるいはプライマーλ1およびλ10のそれぞれに変更した他は上記と同様のPCR反応液を調製した。なお、酸性物質としては200ngの仔牛胸腺DNAまたは5ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加した。反応は、98℃、0秒～68℃、5分を1サイクルとした30サイクルで行なった。その結果、仔牛胸腺DNAまたはフコース硫酸含有多糖-Fを添加した場合には、プライマーλ1およびλ5では4kb、またプライマーλ1およびλ10では15kbの増幅断片がそれぞれ確認さ

れた。一方、これらの酸性物質を添加していないものではどちらのプライマー対でも増幅断片は確認できなかった。

【0059】

(2) Pfu DNAポリメラーゼIの活性への影響

酸性物質であるフコース硫酸含有多糖-FがPfu DNAポリメラーゼIの活性に与える影響を調べた。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには組換えDNA技術を利用して調製された酵素 (Cloned Pfu DNA Polymerase、ストラタジーン社製) を使用した。

【0060】

鋳型としてλ DNA、プライマー対としてプライマーλ 1およびλ 2、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIを含む反応液を調製し、PCRを行なった。

【0061】

反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

Pfu DNAポリメラーゼI用緩衝液 (ストラタジーン社製)、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼI、500 pgの鋳型DNA、5 pmolずつのプライマーλ 1およびλ 2 (最終容量は25 μl)。この反応液に20 ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加したもの、添加しないものの2種の反応液を調製した。

【0062】

調製した反応液について94℃、30秒～55℃、30秒～72℃、60秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。増幅された0.5 kbのDNA断片の量を前記の方法で可視化して比較したところ、フコース硫酸含有多糖-Fを添加した反応液中のDNA増幅量の方が多いことが判明した。このことから、フコース硫酸含有多糖-Fの添加によりPfu DNAポリメラーゼIによるDNA増幅効率が向上することが確認された。

【0063】

実施例4 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種のDNAポリメラーゼを使用したPCR

共に3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであるPfu DNAポリメラーゼIIとPfu DNAポリメラーゼIの両者を同時に使用したPCRについて検討を行なった。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには上記の Cloned Pfu DNA Polymerase (ストラタジーン社製)を使用した。

【0064】

(1) Pfu DNAポリメラーゼI、Pfu DNAポリメラーゼIIを混合して使用するPCR

鋳型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ8を含む反応液を調製し、PCRを行なった。このPCRにはPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの両者を使用した。

【0065】

反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

10mMトリスー塩酸(pH9.2)、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、500pgの鋳型DNA、5pmolずつのプライマーλ1およびλ8。

【0066】

前記反応液に0.375UのPfu DNAポリメラーゼIIおよび0.125、0.375、0.75、1.25UのPfu DNAポリメラーゼIをそれぞれ添加し、反応液の最終容量は25μlとした。また対照として、Pfu DNAポリメラーゼIのみを添加した反応液、Pfu DNAポリメラーゼIIのみを添加した反応液も準備した。

【0067】

これらの反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した

。その結果、Pfu DNAポリメラーゼ I のみでは、その添加量にかかわらず 10 kb の DNA 断片の増幅は確認されなかった。また Pfu DNAポリメラーゼ II のみではごくわずかな 10 kb 断片が認められたが、Pfu DNAポリメラーゼ II に Pfu DNAポリメラーゼ I を添加することによりその添加量依存的に 10 kb 断片の増幅効率が向上していることが確認された。

【0068】

(2) 鎖長の異なる DNA 断片の増幅

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 3、プライマー λ 1 および λ 4 あるいはプライマー λ 1 および λ 5 のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

【0069】

反応液組成：

10 mM トリスー塩酸 (pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、0.01% BSA、1.25 U の Pfu DNAポリメラーゼ I および 1.25 U の Pfu DNAポリメラーゼ II、500 pg の λ DNA、5 pmol ずつの各プライマー、5 ng または 50 ng のフコース硫酸含有多糖-F (最終容量は 25 μ l)。

【0070】

各反応液について 98℃、0 秒～68℃、0 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルの反応を行なった。反応終了後、反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、使用したプライマー対に応じて 1 kb、2 kb、4 kb の DNA 断片が増幅されていることが確認された。フコース硫酸含有多糖-F に関しては 50 ng を添加したものの方が 5 ng に比べて良好な増幅効率を示した。

【0071】

実施例 5 従来の PCR 技術との比較

(1) 長鎖 DNA の増幅

λ DNA を鋳型とした 10～15 kb の DNA 断片の増幅反応について、実施

例4の(2)に記載の反応系と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼとの組み合わせからなるLA-PCR法との比較を行なった。なお、LA-PCR反応液はTaKaRa LA PCR キット Ver. 2 (宝酒造社製)を用いて調製した。

【0072】

プライマー対としてプライマーλ1およびλ8、プライマーλ1およびλ9あるいはプライマーλ1およびλ10のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

【0073】

反応液組成：

10mMトリス-塩酸(pH9.2)、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25UのPfu DNAポリメラーゼIおよび1.25UのPfu DNAポリメラーゼII、500pgのλDNA、5pmolずつの各プライマー、50ngのフコース硫酸含有多糖-F(最終容量は25μl)。

【0074】

また、上記反応液同様の鋳型DNA量、プライマー量としたLA-PCR反応液(最終容量は25μl)を上記のTaKaRa LA PCR キット Ver. 2を用いて調製した。

【0075】

これらの反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例5の(2)に記載のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ10kb、12kbおよび15kbのDNA断片の増幅が確認された。

【0076】

一方、従来のLA-PCRを使用した反応では10kb断片の増幅は確認され

たが、12 kb および 15 kb の断片の増幅は認められなかった。

【0077】

なお、1 サイクルの条件を 98℃、0 秒～68℃、5 分に変更して 12 kb 断片の増幅を試みたところ、この場合には LA-PCR 反応液においても増幅が認められた。

【0078】

(2) 短鎖 DNA の短時間反応による増幅

λ DNA を鋳型とした 0.5～4 kb の DNA 断片の増幅反応について、実施例 4 の (2) に記載の反応系と LA-PCR 法、ならびに DNA 合成速度が高いことが知られている KOD DNA ポリメラーゼの比較を行なった。なお、LA-PCR 反応液は上記の TaKaRa LA PCR キット Ver. 2 を用いて、また、KOD DNA ポリメラーゼ反応液は東洋紡社製の KOD DNA ポリメラーゼと添付の反応用緩衝液を用いてそれぞれ調製した。

【0079】

プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 2、プライマー λ 1 および λ 3 あるいはプライマー λ 1 および λ 5 のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

【0080】

反応液組成：

10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、0.01% BSA、1.25 U の Pfu DNA ポリメラーゼ I および 1.25 U の Pfu DNA ポリメラーゼ II、500 pg の λ DNA、5 pmol ずつの各プライマー、50 ng のフコース硫酸含有多糖-F (最終容量は 25 μl)。

【0081】

また、上記反応液同様のプライマー対を用いた LA-PCR 反応液、KOD DNA ポリメラーゼ反応液 (ともに最終容量は 25 μl) を調製した。ただし、この 2 種の反応液については鋳型である λ DNA を 2500 pg ずつ加えた。

【0082】

これらの各反応液について98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、Pfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ0.5kb、1kbおよび4kbのDNA断片の増幅が確認された。

【0083】

これに対して、従来のLA-PCR反応液、KOD DNAポリメラーゼ反応液では、5倍量の鋳型DNAを含むにもかかわらず0.5kbのDNA断片のみが微弱に増幅されているのが認められたに過ぎなかった。

【0084】

(3) DNA検出感度の比較

微量の λ DNAを鋳型としたDNA断片の増幅反応について、実施例4の(2)に記載の反応系とLA-PCR法の比較を行なった。なお、LA-PCR反応液は上記のTaKaRa LA PCR キット Ver. 2を用いて調製した。

【0085】

プライマー対としてプライマー λ 1および λ 2を使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

【0086】

反応液組成：

10mMトリス-塩酸(pH9.2)、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25UのPfu DNAポリメラーゼIおよび1.25UのPfu DNAポリメラーゼII、0.05fgの λ DNA、5pmolずつの各プライマー、50ngのフコース硫酸含有多糖-F(最終容量は25 μ l)。

【0087】

また、上記反応液同様の鋳型DNA量、プライマー量のLA-PCR反応液を調製した。

【0088】

この両反応液について98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした50サイクルの反応を行なった後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例4の(2)記載の反応系でのみ0.5kbのDNA断片の増幅が認められた。

【0089】

次に、プライマー対をプライマーλ1およびλ8に変更し、上記同様に2種の反応液を調製した。両反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした50サイクルの反応を行なった後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例4の(2)記載の反応系では10kbのDNA断片の増幅が認められたのに対し、従来のLA-PCR反応液ではDNA断片の増幅は認められなかった。

【0090】

実施例6 熱水抽出によるフコース硫酸含有多糖-Fの調製

以下の実施例において使用されたフコース硫酸含有多糖-Fはすべて下記の方法で精製されたものである。以下にフコース硫酸含有多糖-Fの調製例を示す。

【0091】

ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥重量20kgのガゴメ昆布を粉碎し、得られた乾燥粉末を7.3kgの塩化カルシウム・2水和物を含む900リットルの水道水に懸濁し、攪拌しながら40分かけて90℃まで昇温し、90℃～95℃に保持して1時間抽出を行なった。その後、20℃まで冷却し、攪拌を止めて、一晚放置し、抽出物を得た。

【0092】

次に遠心分離機（ウエストファリアセパレーター社製CNA型）を用いて固液分離を行なった。上記抽出物を遠心分離機により、固液分離上清液を約900リ

ットル得た。その内の360リットルを3ミクロンサイズのフィルター（日本食品濾材社製）を組込んだスパクラフィルター（日本染色機械社製）にてろ過した。ろ過液は、分画分子量3万のUF膜（FE10-FC-FUS0382、ダイセル化学工業社製）にて20リットルまで濃縮した後、水道水を20リットル加えて、再度20リットルまで濃縮した。上記のように希釈濃縮操作を5回繰返した後、濃縮液を約25リットル得た。

【0093】

上記濃縮液700mlに最終濃度が0.2M塩化カルシウム、20mM酢酸ナトリウムになるように添加した後、0.2M塩化カルシウムを含む、20mM酢酸ナトリウム平衡化バッファー（pH 6.0）にて透析した。透析処理後の溶液を上記平衡化バッファー10リットルで平衡化した3500mlのDEAE-セファロースFFカラム（カラム内径：9.7cm）にかけ、5リットルの平衡化バッファーで洗浄した。次に下記に示した3段階のグラジエント条件で溶出を行なった。

【0094】

なお、クロマトグラフィーの流速は、3500ml/1時間に設定した。グラジエント条件：

- 1) 0～0.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
（溶出液量：4.5リットル）
- 2) 0.5～1.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
（溶出液量：4.5リットル）
- 3) 1.0～2.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
（溶出液量：4.5リットル）

【0095】

溶出液は、1フラクション当たり250mlずつ集めた。各フラクションについて、フェノール硫酸法で糖定量、カルバゾール硫酸法でウロン酸定量を行なった。その結果、糖含有量が高く、ウロン酸の量が低いフラクションであるフラクションNo. 40～53の画分を得た。フラクションNo. 40～53の画分をフコース硫酸含有多糖-F画分と称す。フコース硫酸含有多糖-F画分を10万

の限外ろ過膜にて濃縮後、50 mMクエン酸ナトリウムにて透析を行ない、さらに蒸留水にて一晚透析した。引き続き、凍結乾燥を行ない、フコース硫酸含有多糖-F画分よりフコース硫酸含有多糖-Fを1.696 g得た。

【0096】

実施例7 熱水抽出によるフコース硫酸含有多糖-Uの調製

以下の実施例において使用されたフコース硫酸含有多糖-Uはすべて下記の方法で精製されたものである。以下にフコース硫酸含有多糖-Uの調製例を示す。

【0097】

ガゴメ昆布の2 tを粉碎し、得られた乾燥粉末を730 kgの塩化カルシウム・2水和物を含む44キロリットルの水道水に懸濁し、攪拌しながら1時間35分かけて95℃まで昇温し、95℃で2時間保持して抽出を行なった。その後、一晚かけて室温まで冷却した。

【0098】

次にデカンタ（タナベウィルテック社製）により固液分離を行なった。運転条件は、3000～3300 rpm（2560 G）で約8時間かけて行なった。得られた固液分離上清液は、分画分子量3万のUF膜（FE10-FC-FUSO382、ダイセル化学工業社製）にて5キロリットルまで濃縮した後、さらにUF脱塩を行なった。

【0099】

上記脱塩液をアドバンテック#327のろ紙（アドバンテック社製）を組込んだリンターフィルター（内外醸機社製）で濁り除去を行なった。濾過液は、プレートヒーター（日阪製作所社製）にて98℃で40秒間殺菌した。得られた抽出液は、約4620リットルであった。該抽出液の一部を凍結乾燥機（共和真空技術社製）にて凍結乾燥した。

【0100】

該凍結乾燥物340 gを0.2 M塩化カルシウムを含む、20 mM酢酸ナトリウム平衡化バッファー（pH 6.0）21.2リットルに溶解した。該溶液を平衡化バッファーで平衡化した約35リットルのDEAE-セファロースFFカラム（カラム内径：35 cm）にかけ、70リットルの平衡化バッファーで洗浄し

た。次に下記に示した3段階のグラジエント条件で溶出を行なった。

【0101】

なお、クロマトグラフィーの流速は、35リットル／1時間に設定した。グラジエント条件：

- 1) 0～0.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
(溶出液量：120リットル)
- 2) 0.5～1.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
(溶出液量：120リットル)
- 3) 1.0～1.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント
(溶出液量：120リットル)

【0102】

溶出液は、1フラクション当たり10リットルずつ集めた。各フラクションについて、フェノール硫酸法で糖定量、カルバゾール硫酸法でウロン酸の定量を行なった。その結果、糖含有量およびウロン酸量が高いフラクションNo. 4～16の画分を得た。フラクションNo. 4～16の画分をフコース硫酸含有多糖-U画分と称す。フコース硫酸含有多糖-U画分を分子量1万カットの限外ろ過膜にて濃縮後、分子量12000～14000カットのセルロースチューブを用いて透析を行なった。まず、50mMクエン酸3ナトリウム2水和物水溶液にて3～4時間おきに該溶液を交換する操作を2回行なった後、さらに該溶液にて一晚透析した。次に蒸留水にて3～4時間おきに蒸留水を交換する操作を2回行なった後、さらに蒸留水にて一晚透析した。引き続き、凍結乾燥を行ない、フコース硫酸含有多糖-U画分よりフコース硫酸含有多糖-Uを37.6g得た。

【0103】

実施例8 酸性物質によるPfu DNAポリメラーゼII活性の促進

以下の実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナル(宝酒造社製)を使用してfastモードで実施した。

【0104】

(1) フコース硫酸含有多糖-F、デキストラン硫酸パウダー及びアルギン酸ナトリウムのPfu DNAポリメラーゼII活性への影響

上記実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-F、デキストラン硫酸パウダー（オンコー社製）、アルギン酸ナトリウム（100～150センチポアズ、和光純薬社製）を使用し、これらがPfu DNAポリメラーゼIIの活性に与える影響を調べた。鋳型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ2、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIIを含む反応液を調製し、PCRを行なった。

【0105】

反応液は以下の組成になるように調製した。

反応液組成：

10mMトリス-塩酸、pH9.2、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、および1.25UのPfu DNAポリメラーゼII、100pgのλDNA、ならびに5pmolずつのプライマーλ1およびλ2（最終容量は25μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ10ngのフコース硫酸含有多糖-F、10ngのデキストラン硫酸パウダーまたは1μgのアルギン酸ナトリウムを添加した。

【0106】

これらの反応液について98℃、5秒～66℃、15秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表2に示す。

【0107】

【表 2】

表 2

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	10 ng	++
デキストラン硫酸パウダー	10 ng	+
アルギン酸ナトリウム	1 μ g	+
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる
+ : 増幅が見られる
± : わずかな増幅が見られる
- : 増幅は見られない

【0108】

表 2 に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される 0.5 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件で PCR を実施したところ、0.5 kb の増幅断片は確認できなかった。

【0109】

(2) フコース硫酸含有多糖-F、フコース硫酸含有多糖-U およびポリグルタミン酸ナトリウムの Pfu DNA ポリメラーゼ II 活性への影響

さらに、酸性物質として上記実施例 6 で得られたフコース硫酸含有多糖-F、上記実施例 7 で得られたフコース硫酸含有多糖-U、ポリグルタミン酸ナトリウム（シグマ社製）の効果について検討を行なった。鋳型の λ DNA 量を 500 pg に、またプライマー対をプライマー λ 1 および λ 3 に変更した他は上記と同様の PCR 反応液を調製した。前記反応液に 5 ng のフコース硫酸含有多糖-F、それぞれ 5 ng、10 ng、20 ng および 30 ng のフコース硫酸含有多糖-U、それぞれ 250 ng、500 ng、750 ng および 1000 ng のポリグルタミン酸ナトリウムをそれぞれ添加した。

【0110】

反応は、98℃、5 秒～66℃、15 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルで行なった。反応終了後、反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを

含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表3に示す。

【0111】

【表3】

表3

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	5 ng	++
フコース硫酸含有多糖-U	5 ng	++
	10 ng	+
	20 ng	+
	30 ng	±
ポリグルタミン酸ナトリウム	250 ng	+
	500 ng	+
	750 ng	++
	1000 ng	+
無添加		—

++: 強い増幅が見られる
 +: 増幅が見られる
 ±: わずかな増幅が見られる
 —: 増幅は見られない

【0112】

表3に示されるように、フコース硫酸含有多糖-F、フコース硫酸含有多糖-Uまたはポリグルタミン酸ナトリウムを添加した場合には、いずれにおいても1 kbの増幅断片が確認された。一方、これらの酸性物質を添加していないものでは1 kbの増幅断片は確認できなかった。

【0113】

実施例9 酸性物質によるTaq DNAポリメラーゼ活性の促進

上記実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-F、またはアルギン酸ナトリウムを使用し、これらがタカラTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）の活性に与える影響を調べた。本実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサ

イクラーパーソナルを使用してノーマルモードで実施した。

【0114】

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1および λ 3、DNAポリメラーゼとしてタカラTaq DNAポリメラーゼを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液は以下の組成になるように調製した。

【0115】

反応液組成：

タカラTaq DNAポリメラーゼ用緩衝液、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、ならびに1.25 UのタカラTaq DNAポリメラーゼ、100 pgの λ DNA、ならびに10 pmolずつのプライマー λ 1および λ 7（最終容量は50 μ l）。さらに前記反応液中に、それぞれ0.1 ngおよび0.25 ngのフコース硫酸含有多糖-F、または1 μ gのアルギン酸ナトリウムを添加した。

【0116】

反応は98℃、10秒～68℃、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。反応終了後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表4に示す。

【0117】

【表 4】

表 4

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	0.1 ng	++
	0.25 ng	++
アルギン酸ナトリウム	1 μ g	+
無添加		-

++: 強い増幅が見られる
 +: 増幅が見られる
 ±: わずかな増幅が見られる
 -: 増幅は見られない

【0118】

表 4 に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される 1 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件で PCR を実施したところ、1 kb の増幅断片は確認されなかった。

【0119】

実施例 10 LA-PCR 用 DNA ポリメラーゼに対する酸性物質の影響

(1) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと該活性を有しない DNA ポリメラーゼの組合わせからなる LA-PCR 法において酸性物質の影響を検討した。鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 8 を含む反応液を調製し、PCR を行なった。この PCR にはタカラ EX-Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を使用した。反応液の組成を以下に示す。

【0120】

以下の実施例において PCR は、タカラ PCR サーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）を使用して fast モードで実施した。

【0121】

反応液組成：

タカラEX-Taq DNAポリメラーゼ用緩衝液、それぞれ0.2mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、10pgのλDNA、1.25UのタカラEX-Taq DNAポリメラーゼならびに10pmolずつのプライマーλ1およびλ8を含む反応液（最終容量は50μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ1ngのフコース硫酸含有多糖-Fまたは0.5μgのアルギン酸ナトリウムを添加した。

【0122】

反応は、98℃、5秒～68℃、3分を1サイクルとした27サイクルで行なった。反応終了後、反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表5に示す。

【0123】

【表5】

表5

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	1ng	++
アルギン酸ナトリウム	0.5μg	++
無添加		—

++：強い増幅が見られる
 +：増幅が見られる
 ±：わずかな増幅が見られる
 —：増幅は見られない

【0124】

表5に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される10kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、10kbの増幅断片は確認されなかった。

【0125】

(2) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼの組合わせからなるKOD dash DNAポリメラ

ーゼ（東洋紡社製）において酸性物質の影響を検討した。鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1および λ 9を含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液の組成を以下に示す。以下の実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）を使用してfastモードで実施した。

【0126】

反応液組成：

KOD λ DNAポリメラーゼ添付専用緩衝液、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、10 pgの λ DNA、2.5 UのKOD λ DNAポリメラーゼならびに10 pmolずつのプライマー λ 1および λ 8を含む反応液（最終容量は50 μ l）。さらに前記反応液中に、それぞれ1 ngのフコース硫酸含有多糖-Fまたは0.5 μ gのアルギン酸ナトリウムを添加した。

【0127】

反応は、98℃、5秒～68℃、3分を1サイクルとした25サイクルで行なった。反応終了後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表6に示す。

【0128】

【表6】

表6

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	1 ng	+
アルギン酸ナトリウム	0.5 μ g	++
無添加		±

++：強い増幅が見られる
 +：増幅が見られる
 ±：わずかな増幅が見られる
 -：増幅は見られない

【0129】

表6に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される12kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、12kbの増幅断片は、微弱なものしか確認されなかった。

【0130】

実施例11 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種のDNAポリメラーゼを使用したPCR

共に3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであるPfu DNAポリメラーゼIIとKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）、VENT DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）、DEEP VENT DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）のいずれかを同時に使用したPCRについて検討を行なった。

【0131】

鋳型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ8を含む反応液を調製し、PCRを行なった。このPCRにはPfu DNAポリメラーゼIIとKOD DNAポリメラーゼの組合わせ、Pfu DNAポリメラーゼIIとVENT DNAポリメラーゼの組合わせまたはPfu DNAポリメラーゼIIとDEEP VENT DNAポリメラーゼの組合わせをそれぞれ使用した。反応液の組成を以下に示す。

【0132】

反応液組成：

10mMトリスー塩酸（pH9.2）、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、500pgのλDNAならびに5pmolずつのプライマーλ1およびλ8。前記反応液に0.375UのPfu DNAポリメラーゼIIおよび3.75mUのKOD DNAポリメラーゼ、6.25mUのVENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼをそれぞれ添加し、反応液の最終容量は25μlとした。

【0133】

また対照として、Pfu DNAポリメラーゼII、KOD DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼのみを添加した反応液も準備した。これらの反応液について98℃、5秒～68℃、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行なった後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。その結果を表7に示す。

【0134】

【表7】

表7

DNAポリメラーゼの組合わせ ポリメラーゼ A / ポリメラーゼ B	使用酵素量 ポリメラーゼ A/ポリメラーゼ B	増幅結果
Pfu DNA ポリメラーゼ II/ —	0.375 U/ —	±
— /KOD DNA ポリメラーゼ	— /3.75 mU	—
— /VENT DNA ポリメラーゼ	— /6.25 mU	—
— /DEEP VENT DNA ポリメラーゼ	— /6.25 mU	—
Pfu DNA ポリメラーゼ II/KOD DNA ポリメラーゼ	0.375 U/3.75 mU	+
Pfu DNA ポリメラーゼ II/VENT DNA ポリメラーゼ	0.375 U/6.25 mU	+
Pfu DNA ポリメラーゼ II/DEEP VENT DNA ポリメラーゼ	0.375 U/6.25 mU	+

++：強い増幅が見られる
 +：増幅が見られる
 ±：わずかな増幅が見られる
 —：増幅は見られない

【0135】

表7に示すように、KOD DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼのみでは10kbの増幅断片が認められなかったが、Pfu DNAポリメラーゼIIのみでは、ごくわずかな10kbの増幅断片が認められた。さらに0.375UのPfu DNAポリメラーゼIIと3.75mUのKOD DNAポリメラーゼ、6.25mUのVENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼを組合わせた系においては、Pfu DNAポリメラーゼIIのみの場合と比較

して 10 kb 断片の増幅効率が向上していることが確認された。

【0136】

実施例 12

実施例 1 で得られた Pfu DNAポリメラーゼ II と α 型 DNAポリメラーゼである Pfu DNAポリメラーゼ I (ストラタジーン社製)、および酸性物質であるアルギン酸ナトリウムを組合わせて PCR 反応を行なった。

【0137】

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 3 を含む反応液を調製し、PCR を行なった。反応液の組成を以下に示す。

【0138】

反応液組成：

PCR 反応バッファー (10 mM トリス-塩酸、pH 9.2、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、0.01% BSA、0.004% アルギン酸ナトリウム)、10 pg の λ DNA ならびに 5 pmol ずつのプライマー λ 1 および λ 3。前記反応液に 1.25 U の Pfu DNAポリメラーゼ II および 1.14 U の Pfu DNAポリメラーゼ I を含む酵素液を添加し、反応液の最終容量は 25 μ l とした。

【0139】

また、対照としてアルギン酸ナトリウム無添加の反応液も準備した。これらの反応液について 98℃、5 秒～66℃、15 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルの反応を行なった後、反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動して、増幅 DNA 断片を確認した。その結果を表 8 に示す。

【0140】

【表 8】

表 8

使用キットの種類	増幅結果
反応バッファー (0.004%アルギン酸ナトリウムを含む)	++
反応バッファー (アルギン酸ナトリウムを含まず)	—

—: 増幅は見られない
 ±: わずかな増幅が見られる
 +: 増幅が見られる
 ++: 強い増幅が見られる

【0141】

表 8 に示すように、Pfu DNAポリメラーゼ I、Pfu DNAポリメラーゼ II およびアルギン酸ナトリウムを組合わせた反応において 1 kb 断片の増幅効率が向上していることが確認された。さらに、市販の各粘度 (100~1000 センチポアズ) のアルギン酸ナトリウムについて上記の検討をしたところ全く同様の DNA 合成の増幅効率の向上が確認された。

【0142】

実施例 13 キットの調製

実施例 1 で得られた Pfu DNAポリメラーゼ II と Pfu DNAポリメラーゼ I、および酸性物質であるアルギン酸ナトリウムを組合わけて本発明の PCR 反応用のキット (20 回分) を構築した。

【0143】

キット組成を以下に示す。

10×PCR 反応バッファー	50 μl
100 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)	
750 mM 塩化カリウム	
0.1% BSA	
0.04% アルギン酸ナトリウム (100~150 センチポアズ)	
25 mM 塩化マグネシウム溶液	120 μl
2.5 mM dNTP ミックス (各 2.5 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP)	80 μl

DNAポリメラーゼ酵素混合液 (2.5 U Pfu DNAポリメラーゼ II および 2.28 U Pfu DNAポリメラーゼ I / 1 μ l) 10 μ l

【0144】

上記のキットを用いてPCR反応液を調製した。鋳型として λ DNAを使用した。表9に反応液組成を示す。

【0145】

【表9】

表9

反応液組成	
10 \times PCR反応バッファー	2.5 μ l
塩化マグネシウム溶液	6 μ l
dNTPミックス	4 μ l
DNAポリメラーゼ酵素混合液	0.5 μ l
λ DNA	10 pg
λ 1プライマー	5 pmol
λ 3プライマー	5 pmol
滅菌蒸留水	残部
最終容量	25 μ l

【0146】

また、対照としてアルギン酸ナトリウムを含まないほかは上記と同じ組成の反応液を調製した。

【0147】

上記反応液を実施例12に示したPCR条件で反応させたところ上記アルギン酸ナトリウムを含むキットによって調製した反応液は、対照と比較して、1 kb断片の増幅効率が向上していることが確認できた。

【0148】

【発明の効果】

本発明により、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するDNAポリメラーゼ活性促進剤が提供される。該促進剤は各種のDNAポリメラーゼに対して作用を示し、その活性を促進する。また、本発明は高効率でのDNA合成を可能とするDNA合成反応用組成物を提供する。上記の促進剤ならびに組成物

はDNAポリメラーゼが使用される各種の工程、例えばPCR法などに利用することができ、遺伝子工学研究用試薬として有用である。また、本発明によれば、多くのサンプルを取り扱う、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、遺伝子診断法などをより短時間に行なうことができるという優れた効果を奏する。

【0149】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for DNA synthesis

<130> TS-10-011

<150> JP 10-114005

<151> 1998-4-23

<160> 11

【0150】

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gatgagttcg tgtccgtaca act

23

【0151】

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

acaaagccag ccggaatattc tg

22

【0152】

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gatgagttcg tgtccgtaca actggcgtaa tcatg

35

【 0 1 5 3 】

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggttatcgaa atcagccaca gcgcc

25

【 0 1 5 4 】

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gcgtaccttt gtctcacggg caa

23

【 0 1 5 5 】

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gatagctgtc gtcataaggac tc

22

【 0 1 5 6 】

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

cttaaccagt gcgctgagtg act

23

【 0 1 5 7 】

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttgccacttc cgtcaaccag gcttatca

28

【 0 1 5 8 】

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

tgtccgtcag ctcataacgg tacttcacg

29

【 0 1 5 9 】

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

atatctggcg gtgcaatata ggtactgt

28

【 0 1 6 0 】

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gacaatctgg aatacgccac ctgacttg

28

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

遺伝子工学分野において有用であり、操作に要する時間を短縮しうるDNAの合成方法、該方法に使用される組成物及びキットを提供すること。

【解決手段】

酸性物質を含有したDNAポリメラーゼ活性促進剤、活性促進剤の存在下にDNAポリメラーゼを用いて反応を行なうDNA合成方法、前記活性促進剤を含有したDNA合成反応用組成物、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有したDNA合成反応用組成物、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用するDNA合成方法及びそのキット、前記活性促進剤及びDNAポリメラーゼを含有したキット、過剰量のDNAポリメラーゼを使用するDNA合成方法、並びに過剰量のDNAポリメラーゼを含有したDNA合成反応用組成物。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第315243号
受付番号	59800708219
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 4月15日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	591038141
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区竹中町609番地
【氏名又は名称】	寶酒造株式会社

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100095832
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区谷町2丁目8番1号 大手前 M2ビル5階 細田国際特許事務所
【氏名又は名称】	細田 芳徳

特平10-315243

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日	1991年 2月 4日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名	寶酒造株式会社